

CERTIFICATE

(Translation)

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA.

FILING DATE:	August 4, 2003
APPLICATION NUMBER:	03 1 49656.3
APPLICATION CATEGORY:	Invention
ENTITLED:	Oligonucleotides antagonist for Human tumor necrosis factor α (TNF α)
APPLICANTS:	Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention
INVENTORS:	Zhiqing Zhang Xinrui Yan Ketai Guo Chunxiao Xu

THE STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC
OF CHINA

DIRECTOR GENERAL: Jingchuan, WANG

ISSUE DATE: January 5, 2004

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003.08.04

申 请 号： 03149656.3

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸

申 请 人： 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

发明人或设计人： 张智清

Zhiqing ZHANG et al.
April 13, 2004
BSKB
(703) 205-8000
4533-0108 PUS1
2 of 2

P3552/CDC

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2004 年 1 月 15 日

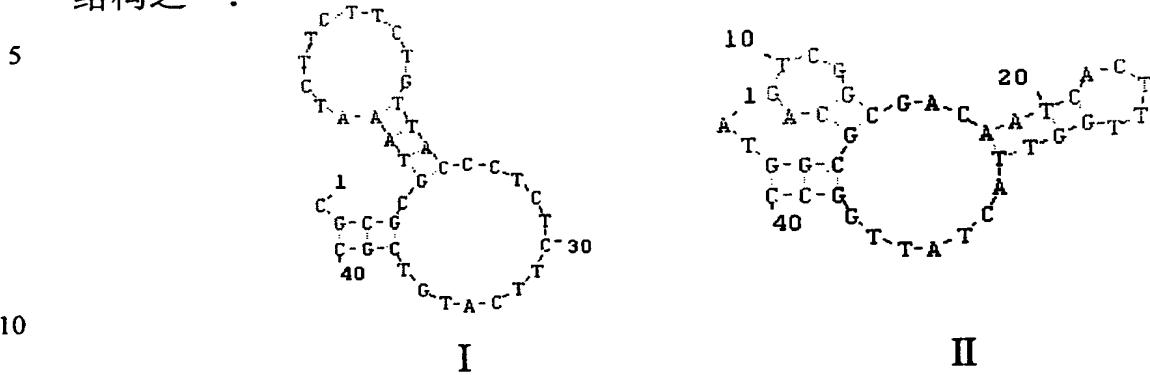
权利要求书

1. 一种能与人肿瘤坏死因子(TNF)特异结合的寡聚核苷酸序列,
选自:

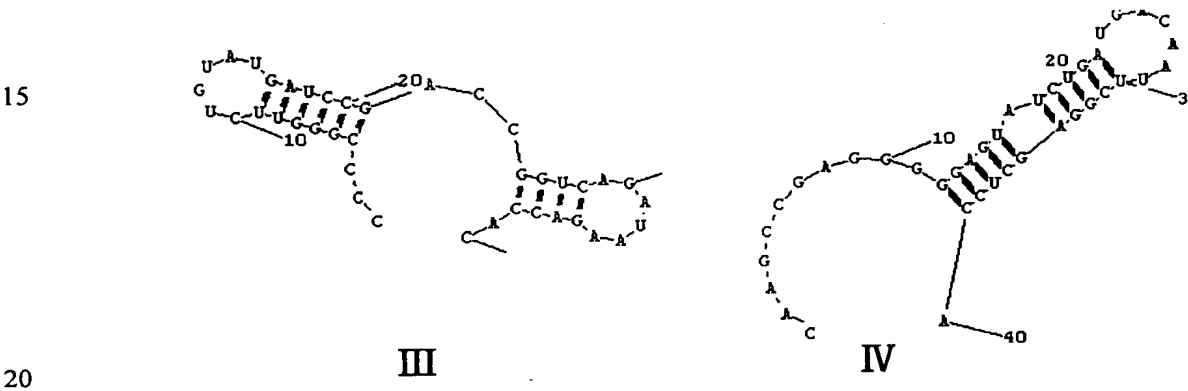
- 5 a) SEQ NO. 1 所示的寡聚核苷酸;
- b) SEQ NO. 2 所示的寡聚核苷酸;
- c) SEQ NO. 3 所示的寡聚核苷酸;
- d) SEQ NO. 4 所示的寡聚核苷酸;
- e) SEQ NO. 5 所示的寡聚核苷酸;
- 10 f) SEQ NO. 6 所示的寡聚核苷酸;
- g) SEQ NO. 7 所示的寡聚核苷酸;
- h) SEQ NO. 8 所示的寡聚核苷酸;
- i) SEQ NO. 9 所示的寡聚核苷酸;
- j) SEQ NO. 10 所示的寡聚核苷酸;
- 15 k) SEQ NO. 11 所示的寡聚核苷酸;
- l) SEQ NO. 12 所示的寡聚核苷酸;
- m) SEQ NO. 13 所示的寡聚核苷酸;
- n) SEQ NO. 14 所示的寡聚核苷酸;
- o) SEQ NO. 15 所示的寡聚核苷酸;
- 20 p) SEQ NO. 16 所示的寡聚核苷酸;
- q) SEQ NO. 17 所示的寡聚核苷酸;
- r) SEQ NO. 18 所示的寡聚核苷酸;
- s) SEQ NO. 19 所示的寡聚核苷酸;
- t) SEQ NO. 20 所示的寡聚核苷酸;
- 25 u) SEQ NO. 21 所示的寡聚核苷酸;
- v) SEQ NO. 22 所示的寡聚核苷酸;
- w) SEQ NO. 23 所示的寡聚核苷酸;
- x) SEQ NO. 24 所示的寡聚核苷酸;
- y) SEQ NO. 25 所示的寡聚核苷酸;
- 30 z) SEQ NO. 26 所示的寡聚核苷酸;
- aa) SEQ NO. 27 所示的寡聚核苷酸;

bb) SEQ NO. 28 所示的寡聚核苷酸。

2. 根据权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列, 包括 DNA 序列, RNA 序列, 其特征在于所述的 DNA SEQ NO. 1-18 的序列具有以下两种二级结构之一:



3. 根据权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列, 其特征在于所述的 RNA SEQ NO. 19-28 的序列具有以下两种二级结构之一:



4. 一种具有与权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列至少 70%同源并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列截短后并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

6. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列修饰后并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

7. 一种在严紧条件下与权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

8. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列的衍生序列。

9. 如权利要求 1、5、6、7 中任意一项所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

说明书

抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸

5 技术领域

本发明涉及一组新的寡聚核苷酸序列。具体而言，本发明涉及一组新的抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸。目的寡聚核苷酸是利用 SELEX 技术，从随机的寡聚核苷酸库筛选到的与 TNF α 特异结合的适配子 (Aptamer)。本发明还涉及所述寡聚核苷酸序列的衍生序列，
10 包括修饰后的序列。本发明进一步涉及所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

背景技术

人肿瘤坏死因子 α (hTNF α) 是巨噬细胞/单核细胞活化产生的一种多功能细胞因子，具有广泛的生物学活性，在炎症反应、免疫调节、抗肿瘤、抗微生物与寄生虫感染方面起重要作用，在人细胞因子免疫调节网络中起中枢调节作用。在患炎症、自身免疫病、变态反应、休克等疾病时，TNF- α 的表达量成百上千倍的增加，促进炎症过程，使病情加重。由于 TNF- α 是一种重要的致病因子，与许多自身免疫疾病
15 如：成人类风湿性关节炎 (RA)、儿童多发性风湿性关节炎 (JRA)、脓毒血症、心肌细胞死亡、系统性红斑狼疮 (SLE) 及糖尿病等密切相关，所以拮抗 TNF- α 是治疗这些疾病的重要措施之一 (Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system, Immunology, 1998,10:423~434)。

25 已经有多种用于治疗这些疾病的 TNF 抑制剂。(Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2001 May;1(1):45-65) 例如：美国 Johnson & Johnson 公司推出的治疗类风湿性关节炎、局限性肠炎的新药 Infliximide (Avakine; ReMicade)，已于 1998 年 11 月上市。
30 Infliximide 为以 TNF 为靶蛋白的嵌合抗体。美国 Immunex 公司推出的治疗类风湿性关节炎、局限性肠炎的新药 Eterncept (Embrel; Enbrel)，

已于 1998 年 12 月上市。Eternercept 为 IgG1 Fc 区与肿瘤坏死因子(TNF)受体 p75 的融合蛋白。(Etanercept in rheumatoid arthritis. Expert opin Pharmacother.2001,2(7):1137~1148) (Psoriatic arthritis: the role of TNF inhibition and the effect of its inhibition with etanercept. Clin Exp Rheumatol. 2002 Nov-Dec;20(6 Suppl 28):S116-21.)。虽然蛋白质药物的使用取得了较好的疗效,但是也存在许多缺点。蛋白质的生产工艺复杂,成本昂贵;蛋白质药物分子量大,因而组织渗透性差,很难到达靶组织;由于血浆清除率很低,难以排泄,造成其在体内聚积,引起不良反应;由于外源蛋白的引入及结构的变化,使其具有免疫原性,反复使用后会诱生抗体。小肽具有优良的药代动力学性质,组织渗透性增强。然而,由于缺乏可用的靶分子,亲和力低等缺点使其在临床应用时受到限制。(What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. J Rheumatol Suppl. 2002 Sep;65:33-8.)

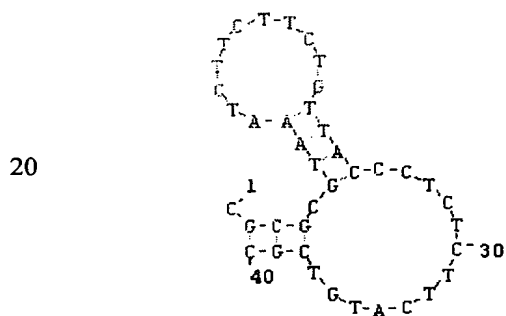
15 发明内容

为了克服现有技术的不足之处,本发明提供一组能与 TNF 特异结合的寡聚核苷酸序列,包括 DNA 序列(NO. 1-18)RNA 序列(NO. 19-28)它们选自:

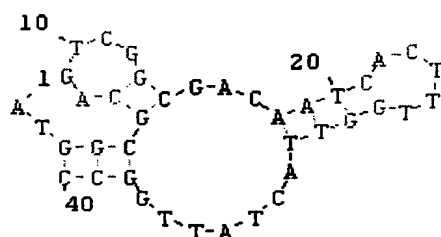
- a) SEQ NO. 1 所示的寡聚核苷酸;
- 20 b) SEQ NO. 2 所示的寡聚核苷酸;
- c) SEQ NO. 3 所示的寡聚核苷酸;
- d) SEQ NO. 4 所示的寡聚核苷酸;
- e) SEQ NO. 5 所示的寡聚核苷酸;
- f) SEQ NO. 6 所示的寡聚核苷酸;
- 25 g) SEQ NO. 7 所示的寡聚核苷酸;
- h) SEQ NO. 8 所示的寡聚核苷酸;
- i) SEQ NO. 9 所示的寡聚核苷酸;
- j) SEQ NO. 10 所示的寡聚核苷酸;
- k) SEQ NO. 11 所示的寡聚核苷酸;
- 30 l) SEQ NO. 12 所示的寡聚核苷酸;
- m) SEQ NO. 13 所示的寡聚核苷酸;

- n) SEQ NO. 14 所示的寡聚核苷酸;
 o) SEQ NO. 15 所示的寡聚核苷酸;
 p) SEQ NO. 16 所示的寡聚核苷酸;
 q) SEQ NO. 17 所示的寡聚核苷酸;
 5 r) SEQ NO. 18 所示的寡聚核苷酸;
 s) SEQ NO. 19 所示的寡聚核苷酸;
 t) SEQ NO. 20 所示的寡聚核苷酸;
 u) SEQ NO. 21 所示的寡聚核苷酸;
 v) SEQ NO. 22 所示的寡聚核苷酸;
 10 w) SEQ NO. 23 所示的寡聚核苷酸;
 x) SEQ NO. 24 所示的寡聚核苷酸;
 y) SEQ NO. 25 所示的寡聚核苷酸;
 z) SEQ NO. 26 所示的寡聚核苷酸;
 aa) SEQ NO. 27 所示的寡聚核苷酸;
 15 bb) SEQ NO. 28 所示的寡聚核苷酸。

所述的 SEQ NO. 1-18 为 DNA 序列, 具有以下两类二级结构:

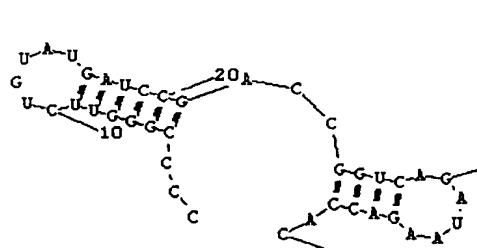


I

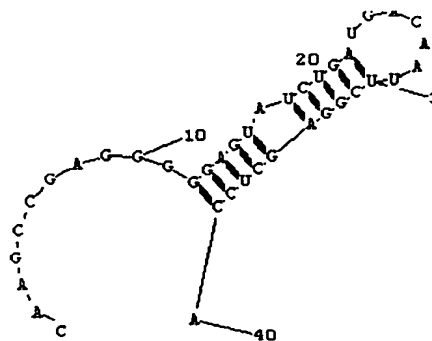


II

25 所述的 SEQ NO: 19-28 为 RNA 序列, 具有以下两类二级结构:



III



IV

本发明还涉及具有与所述的寡聚核苷酸序列至少 70%同源并且具有相似功能的寡聚核苷酸序列。

本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列截短后并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

5 本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列修饰后并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

本发明进一步涉及在严紧条件下与所述的寡聚核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列的衍生序列。

10 本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

本发明所述的寡聚核苷酸序列即适配子，是采用 SELEX 过程筛选出的寡聚核苷酸，它可以是单链 RNA、单链 DNA、双链 DNA。适配子能与靶分子特异性结合，抑制其生物学作用。与蛋白质相比，适配子的优点在于，高特异性、高亲和力；很快到达靶组织；快速的血浆清除率；从肾脏排泄；免疫原性低，可以反复使用；在靶组织中保持高浓度。寡聚核苷酸可以通过体外合成获得，易于生产和纯化，未混入其它蛋白和抗原，不易引起人体的免疫反应。它还具有如下优点：
15 可以进行广泛的位点特异性修饰，这就使它可进行特殊目的的研究与应用。在研究工作中，它可以被荧光染料、放射性同位素、生物素标记。在临床应用中，它可以与放射性核苷酸、细胞毒素和其他毒物相连。

所有的蛋白表位都适合作为适配子的靶位点，SELEX 筛选出的寡聚核苷酸作为拮抗剂时，解离常数为 50pM-10nM，靶分子与受体结合的 K_{is} 与之基本相同。所以，寡聚核苷酸可以与受体竞争结合靶分子。
25

适配子与靶分子的亲和力很高，它高于 ScFv 和噬菌体展示的短肽。而且，适配子的大小为 8-15KD，它的分子量在小肽(1KD)和 ScFv(25KD)之间，二聚适配子的分子量大小与 ScFv 相近。

30 所述的寡聚核苷酸序列即适配子能有效抑制 TNF α 对 L929 细胞的

杀伤作用,说明适配子能有效抑制 TNF α 与其受体的结合。因此,本发明适配子可用于治疗由于 TNF α 水平升高而引起的疾病。它既有单克隆抗体的亲和力和特异性,又具有小分子多肽的渗透性和药代动力学性质。

5

附图说明

图 1 为 SELEX 产物的 PCR 电泳结果。可以看出 PCR 产物大小为 71bp 左右。

10 图 2 显示 ELISA 法检测适配子与 TNF 的亲和力。纵坐标为 OD450 的值,横坐标 1—18 为筛选到的 18 个适配子,19 为空白对照(未包被 TNF),20 为阴性对照 1(未加核酸),21 为阴性对照 2(原始寡聚核苷酸库)。

15 图 3 显示 Dot-ELISA 法检测适配子对 TNF 的亲和性。ssDNA 量在 4 μ g 后,显色信号强度不再增强,当 ssDNA 量少于 10^{-6} μ g 时,无显色信号出现。

图 4 为不同生长状态下的 L929 细胞。(1)为正常状态的 L929 细胞;(2)为 50%被 TNF 杀死的细胞(3)为加入核酸-TNF 混合物的细胞;(4)为 100%被 TNF 杀死的细胞。

20 图 5 为 ELISA 法检测 1—12 轮筛选出的 RNA 适配子与 TNF 的亲和力。

图 6 显示 Dot blot 检测 RNA 适配子对 TNF 的亲和性,RNA 与 TNF 结合,其中 1-10 为所筛选的 10 个 RNA 序列;11 为初始 RNA 库;12 为阴性对照(未加 TNF α)。

25 图 7 为 RNA 与 TNF 结合的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果,其中 1 为 marker,2-11 为 RNA 与 TNF,12 为原始 RNA 库与 TNF,13 为 TNF。

图 8 为 ELISA 法检测目的 RNA 与 TNF α 的结合的结果,其中,1-10 为 10 个 RNA 序列;11 为 RNA 库。

30 图 9 为 ELISA 法检测目的 RNA 与 TNF α 的结合力的结果,其中,系列 1 为 RNA SEQ NO.25,系列 2 为截短后的 RNA SEQ NO.25;系列 3 为截短和修饰后的 RNA SEQ NO.25。

图 10 显示了 MTT 法检测不同稀释度的截短和修饰后的 RNA SEQ

NO.25 对 TNF α 杀伤 L929 细胞的保护作用, 其中 TNF 的量分别为 1 单位和 10 单位。

图 11 为 85% 的小鼠血清降解截短和修饰后的 RNA SEQ NO.25 反应的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果, 其中 1 为 47bp 的 DNA 模板, 2-7 分别为消化 0、1、2、4、8、16 小时的修饰后的适配子, 8-13 分别为消化 0、1、2、4、8、16 小时的未修饰的适配子。

具体实施方式

下面以实施例的方式对本发明作进一步阐述, 但仅仅是为了阐明本发明, 而非限制本发明。本领域技术人员将会理解, 在不背离本发明发明点的情况下, 可以作多种修改与变化, 这些修改与变化也将包括在本发明的范围之内。

本发明人用 SELEX 方法筛选到寡聚核苷酸适配子。本文中术语“SELEX”是指“指数富集式配基系统进化”(system evolution of ligands by exponential enrichment)的英文缩写。由于单链寡聚核苷酸无论在分子结构和功能上都具有多样性, 因此构建单链寡聚核苷酸的随机序列组合库, 使其与结合在膜上的靶蛋白分子结合, 洗去非特异性结合的寡聚核苷酸, 然后在变性的条件下洗脱特异性结合的寡聚核苷酸, 经 PCR 扩增用于下一轮筛选。初步筛到的寡聚核苷酸分子经过多轮的扩增和筛选, 便可筛选到与靶蛋白具有高亲和力的寡聚核苷酸分子, 即适配子(Aptamer)。1990 年, Tuerk 和 Gold 用 SELEX 方法筛选出 T4 RNA 聚合酶的适配子, (system evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, Tuerk C., Gold L. Science. Vol 249 505-510, 1990) 随后 Ellington 和 Szostak 对适配子用于科研和工业生产产生了兴趣, 适配子很快成为极有价值的研究工具, 并且在基础研究, 药物筛选及临床诊断和治疗方面显示出广泛的应用前景。(In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990 Aug 30; 346(6287):818-22.) 目前, 国外已有多种适配子药物进入临床试验阶段, 例如: 用于治疗凝血和血栓形成、治疗内膜增生和抑制血管生成等药物。(Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Chem Biol. 1995 Oct;2(10):683-95.) (Oligonucleotide inhibitors of human

thrombin that bind distinct epitopes. J Mol Biol. 1997 Oct 10;272(5):688-98.) (Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. J Biol Chem. 1998 Aug 7;273(32):20556-67)

5 本发明中用于 SELEX 的单链 DNA 随机库及引物由大连 Takara 公司合成, 两端为固定序列, 中间为 40 个碱基的随机序列: 5'-ggg agg acg atg tta (N40) aag aag act cgc aag a-3', 库容量为 10^{15} - 10^{16} , 引物 1: 5' -ggg agg acg atg tta-3', 引物 2: 5' -tct tgc gag tct tct t-3', 引物 3: 5' -taa tac gac tca cta ta-3', 引物 4: 5' -taa tac gac tca cta ta ggg agg acg atg tta-3'。TNF α 为本实验室制备, T7 体外转录试剂盒购于 Promega 公司, MLV 逆转录酶购于 Biolab 公司, 硝酸醋酸混合纤维素滤膜 HATF 购于 Millipore 公司, 寡聚核苷酸的纯化试剂购于 Qiagen 公司, T 载体购于大连 Takara 公司, 其它常规试剂购于各大试剂公司。以下是筛选和鉴定寡聚核苷酸的技术路线。

15 ssDNA 随机寡聚核苷酸库的合成 \longrightarrow 利用 SELEX 方法对寡聚核苷酸库进行筛选 \longrightarrow 扩增与 TNF 特异结合的寡聚核苷酸 \longrightarrow 进行下一轮筛选 \longrightarrow 12-15 轮筛选后获得目的寡聚核苷酸序列 \longrightarrow 克隆测序 \longrightarrow 与 TNF α 的结合活性检测 \longrightarrow 生物学活性检测。

下文中实施例 1-4 为 DNA 适配子的筛选、鉴定和生物学活性的检测。

20 实施例 5-15 为 RNA 适配子的筛选、鉴定和生物学活性的检测。

实施例 1: 体外筛选与 TNF 特异结合的适配子

扩增 DNA 库

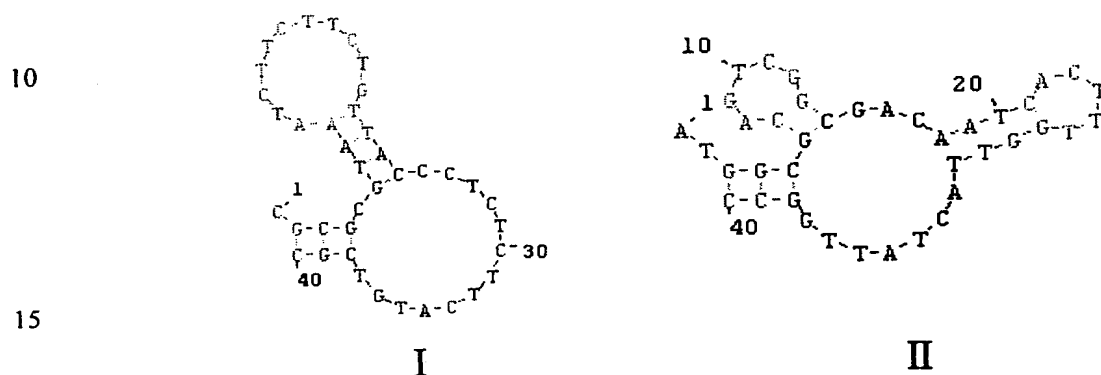
利用引物 1, 引物 2 扩增单链 DNA 库, 然后取 1 μ l 做不对称 PCR, 产物回收后加结合缓冲液 (Binding buffer) (2×1 M NaCl, 40mM TrisCl, 2mM MgCl₂) 200 μ l, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 冰浴 5min; 加入 1ul TNF (1ug/ μ l), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后通过滤膜, 先用 PBS 冲洗, 然后用 300ul 洗脱缓冲液浸泡 (10mM EDTA, 7M 尿素的结合缓冲液), 乙醇沉淀回收 DNA, 取上述溶解物 10 μ l 作模板, 进行下一轮筛选。在最后几轮筛选中, 用少量 TNF, 以便得到预期具有高亲和力的寡聚核苷酸, 共
30 进行 12 轮筛选。

克隆和测序

筛选 12 轮后，将最后的筛选产物连接到 pGEM T-载体(Promega)上，经 PCR 鉴定后测序，得到 18 个适配子（即目的寡聚核苷酸序列）。PCR 结果见图 1。这 18 个适配子核酸序列见 SEQ ID NO. 1-18。

实施例 2：目的适配子的二级结构分析

- 5 用 DNASYS v2.5 软件分析 18 个适配子序列的最低二级结构能量，模拟其二级结构，发现至少可能存在 2 种具有特征性的二级结构形状。其一如下式 I 为代表，主要特征为双茎环结构；其二如下式 II 为代表，主要特征为三茎环结构。



实施例 3：DNA 适配子与 TNF 亲和力的测定

合成生物素标记的 DNA 适配子，用两种方法测定目的适配子与 TNF 的亲和力。

- 20 1. 常规 ELISA: 用 1ug/ml TNF 包被 96 孔酶标板；1% BSA 37°C 封闭 2 小时；将 5' 标记生物素的 DNA 适配子倍比稀释后加入各孔，37°C 温育 1 小时；加入 1:400 稀释的辣根过氧化酶标记的链亲和素 100 μ l，37°C 温育 1 小时；加入显色液避光显色，在酶标仪上读取 OD450 值。结果见附图 2。

- 25 2. Dot-ELISA 法: 将不同浓度的 5' 标记生物素的核酸与 TNF 混合，37°C 水浴 1h。将 TNF 和标记核酸的混合物加到 NC 膜上。洗去未结合的核酸，加辣根过氧化酶标记的链亲和素于膜上，37°C 温育 30min。然后 DAB 显色。结果见附图 3。其中，ssDNA 量在 4ug 后，显色信号强度不再增强，当 ssDNA 量少于 10^{-6} ug 时，无显色信号。

- 30 以上结果表明我们筛选到的 DNA 适配子与 TNF 的结合是特异性的，并具有高亲和力。

实施例 4: 适配子拮抗 TNF 活性的检测

96 孔培养板培养的小鼠 L929 细胞, 每孔加入含 1 μ g/ml 的丝裂霉素和 TNF 与不同浓度寡核苷酸的混合物。24h 后观察细胞的杀伤情况。用 MTT 法测定细胞的存活率。结果见附图 4, 其中 A 为正常状态的 L929 细胞; B 为 50% 被 TNF 杀死的细胞; C 为加入核酸-TNF 混合物的细胞; D 为 100% 被 TNF 杀死的细胞。结果表明, 我们筛选得到的核酸适配子能抑制 TNF 对 L929 细胞的杀伤作用。

以下为利用 SELEX 技术筛选与 TNF 特异结合的 RNA 适配子的实施例。

实施例 5: 单链 DNA 库扩增获得含 T7 启动子的双链 DNA 库

利用引物 2: 5' -tct tgc gag tct tct t-3', 引物 3: 5' -taa tacgac tca cta ta-3' 和引物 4: 5' -taa tac gac tca cta ta ggg agg acg atg tta-3', 扩增单链 DNA 库, 扩增产物用 Qiagen 公司的核酸纯化试剂盒进行纯化。

实施例 6: 体外转录获得单链 RNA 库

将 1nmol DNA 模板与缓冲液、T7RNA 多聚酶和 RNA 酶抑制剂混合后, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 加入 RQ1 DNA 酶 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。转录产物用 Qiagen 公司的核酸纯化试剂盒纯化。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果证明我们获得 71 个碱基的体外转录产物。

实施例 7: 从单链 RNA 库获得与 TNF 结合的寡聚核苷酸

1nmol ssRNA, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 冰水浴 5min, 加入结合缓冲液 (含 1mM MgCl₂, 10mM DTT 的 PBS 溶液) 180 μ l, 200pmol TNF, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后通过滤膜。PBS 冲洗后, 将膜放入 300 μ l 洗脱缓冲液浸泡 (含 10mM EDTA, 7M 尿素的结合缓冲液), 乙醇沉淀回收 RNA。产物经 RT-PCR 获得双链 DNA, 纯化后进行体外转录, 其产物用于下一轮筛选。在最后几轮筛选中, 用少量 TNF, 从而得到与 TNF 具有高亲和力的寡聚核苷酸, 共进行 12 轮筛选。

实施例 8: ELISA 法测定每一轮筛选到的 RNA 适配子与 TNF 的亲合力

将每一轮 RT-PCR 的产物进行体外转录, 掺入生物素标记的 UTP (标记的 UTP 与未标记 UTP 1/2 混合) 进行标记。用 50 μ l TNF (1 μ g/ml) 包

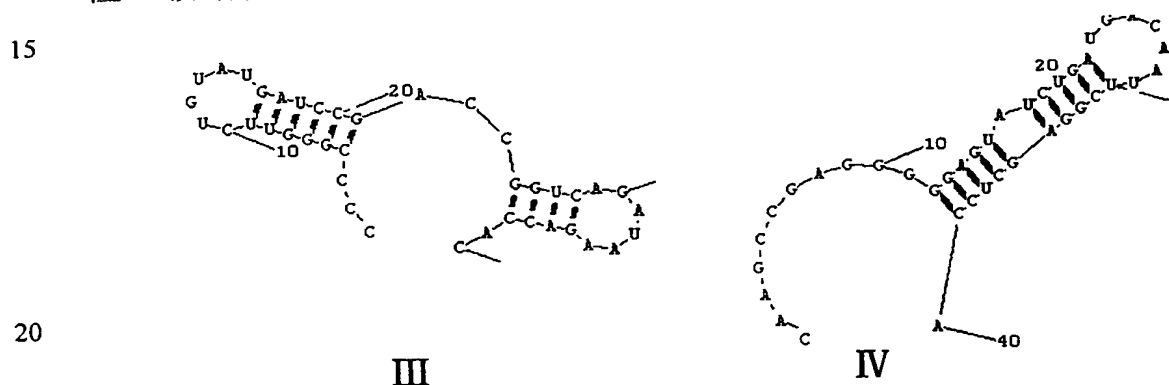
被酶标板，4℃过夜，100 μl 1%BSA 封闭。然后与 50 μl 生物素标记的 RNA 在 37℃ 孵育 1 小时。加入辣根过氧化物酶标记的亲合素 50 μl。最后加入底物显色。用酶标仪测定显色结果，见附图 5。随着筛选轮数的增加，适配子与 TNF α 的结合活性升高。第 12 轮筛选后，结合活性不再升高。

实施例 9：目的寡聚核苷酸序列的克隆和序列测定

将第 12 轮筛选的产物经 RT-PCR 获得双链 DNA，连接到 pGEM-T 载体。转化大肠杆菌 DH5 α。挑取白色菌落，提取质粒，PCR 鉴定阳性克隆。以其为模板扩增双链 DNA，然后体外转录获得 ssRNA，用打点法测定其与 TNF α 的结合活性。挑选阳性克隆测定核苷酸序列。结果见 SEQ ID NO. 19-28，共得到 10 个对 TNF α 具有高亲和力的序列。

实施例 10：RNA 适配子序列的二级结构分析

用 RNA structure 软件分析 RNA 的二级结构，获得以下两种代表性二级结构。



其一以结构 III 为代表，主要特征为 5' 端或 3' 端是单茎环或双茎环结构；其二以结构 IV 为代表，主要特征为三茎环结构。

25 实施例 11：斑点杂交法测定寡聚核苷酸与 TNF α 的亲合力

经 12 轮筛选获得的寡聚核苷酸序列，合成其对应的寡聚 DNA 作模板，体外转录获得寡聚 RNA。取 10ng 生物素标记的 RNA 与 100ng TNF α 加入结合缓冲液 20 μl，37℃，30min 后，点样到纤维素膜。2% BSA 封闭 37℃ 孵育 1 小时。加入辣根过氧化物酶标记的亲合素，最后加二

氨基联苯胺显色。结果见图 6，表明 10 个 RNA 适配子与 TNF α 有不同程度的结合，RNA 原始库与 TNF α 结合很低。

实施例 12：应用凝胶滞后试验检测适配子与 TNF 的结合

如实施例 11 中体外转录获得 40 个碱基的寡聚 RNA，95℃变性 5min，
5 迅速冰水浴 5min，加入结合缓冲液 10 μ l，0.2 μ l TNF，37℃，30 min(水浴)。上样到 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳，银染观察结果。RNA 1-10 与 TNF 结合后发生凝胶滞后现象。RNA 库与 TNF α 无结合，无凝胶滞后现象。

实施例 13：ELISA 法检测 RNA 适配子与 TNF α 的结合活性

10 将体外转录获得的寡聚 RNA 连续稀释，用 ELISA 法检测其与 TNF α 的结合活性，结果见图 7。10 个 RNA 适配子与 TNF α 有不同程度的结合，其中 5、6、7、8、10 与 TNF α 的结合力较强，当浓度为 3ng/ml 时仍为阳性结果，RNA 库与 TNF α 几乎测不到结合。

实施例 14：RNA 适配子抑制 TNF 的细胞毒作用

15 体外转录获得的 RNA 适配子 100ng 用含 10%FBS、1 μ g/ml 丝裂霉素的 RPMI1640 培养基连续稀释后加入 hTNF α ，使其终浓度为 10unit。37℃孵育 2hr。在鼠 L929 细胞检测 hTNF α 残留的体外生物学活性。MTT 染色，570nm 测 OD 值。附图 8 显示不同稀释度的寡聚核苷酸样品对 10 unit TNF α 杀伤 L929 细胞的保护作用，且具有一定的剂量关系，
20 10ng/ml 的样品仍可保护 50%的细胞免遭破坏。

实施例 15：截短的寡核苷酸适配子

为降低化学合成 Aptamer 的成本，我们将筛选出的寡核苷酸适配子在保留高亲和力的基础上缩短。选四个结合活性较高，生物学活性较好的适配子 SEQ NO. 20、23、25、26 截短至 30bp 左右，只保留与其
25 生物学功能相关的茎环结构。其序列如下：

SEQ NO. 20 截短后的序列：GCGUAGCAAACGCACCGCAC AGGCCCGCGG

SEQ NO. 23 截短后的序列：CACUCAAUUCG AGUGCACGGC AAAGCUUCCG

SEQ NO. 25 截短后的序列：CCUCAUAGAC UACUGUUAAG CCUCGAGG

SEQ NO. 26 截短后的序列:AUGCCUAAUC CAACAUCGAG UCUGGUCAU

我们用 ELISA 法检测了截短的 RNA 适配子与 TNF α 的结合活性, 结果见图 9。1, 2 分别为全长的和截短后的 SEQ NO. 20。3, 4 分别为全长的和截短后的 SEQ NO. 23。5, 6 分别为全长的和截短后的 SEQ NO. 25。7, 8 分别为全长的和截短后的 SEQ NO. 26。结果表明, 截短后的 RNA 适配子的亲和力有所改变, 其中两个适配子 RNA SEQ NO. 20 和 SEQ NO. 25 的活性稍有降低, 而 RNA SEQ NO. 23 和 SEQ NO. 26 适配子的活性明显降低。

实施例 16: 化学修饰寡核苷酸适配子

化学修饰可提高寡核苷酸适配子的稳定性和生物利用度。修饰是一个经验过程。每次修饰后, 都要重新检测它的亲和力和抑制活性。我们分别用 2-氟和 2-氨基修饰了截短前的四个 RNA 适配子, 和截短后的 RNA 适配子中的嘧啶碱基, 然后对其亲和力和抑制活性进行测定。检测方法如实施例 13、实施例 14 所述。结果表明, RNA aptamer SEQ NO. 20、25 截短和修饰后的 RNA 适配子的亲和力和抑制活性没有改变。

我们用 ELISA 法检测截短和修饰后的适配子与 hTNF α 的亲合活性。当稀释度为 3ng/ml 时仍为阳性结果, 呈现较明显的剂量反应关系。图 10 中三条曲线分别代表, RNA aptamer SEQ NO. 25, 其截短的适配子和氨基修饰的适配子, 可见经过截短和修饰的适配子未改变其结合活性。进一步实验证明, 经过截短和修饰后的适配子保持了原有的抑制 TNF 的活性。我们用 MTT 法检测适配子抑制 hTNF α 细胞毒性, 结果见图 11。当加入 1Unit 的 TNF 时, 1ng/ml 的样品可保护细胞免遭破坏。当加入 10Unit 的 TNF 时, 则需 10ng/ml 的样品才可保护细胞免遭破坏, 具有明显的剂量反应关系。

实施例 17: RNA 适配子在血清中的稳定性试验

取 500ng 未修饰和氨基修饰的 RNA 适配子 SEQ NO. 31, 分别加入 200 μ l 未灭活的新鲜人血清, 加 PBS 至总体积为 240 μ l。混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴。分别于反应后第 0、1、2、4、8、16 小时各取 40 μ l 样品, 酚: 氯仿抽提后, 取 10 μ l 作 20%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 银染后观察结果。结果见附图 12。1 为 47bp 的 DNA 模板, 2-7 分别为消化 0、1、2、4、

8、16 小时的修饰后的适配子，8-13 分别为消化 0、1、2、4、8、16 小时的未修饰的适配子。结果显示，氨基修饰后的适配子的稳定性显著增高。用紫外分光光度计测定 RNA 适配子的浓度。结果表明氨基修饰后的 RNA 适配子稳定性好，在血清中半衰期为 8 小时左右。

5 实施例 18: RNA 酶对 RNA 降解试验

取 250ng RNA 截短并修饰的适配子 SEQ NO. 25，加入 RNA 酶达终浓度 $20 \mu\text{g/ml}$ ，置 37°C 水浴。分别于不同时间取 $20 \mu\text{l}$ 样品，酚:氯仿抽提后，20%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳，银染观察结果。可以看到反应 1 小时后，RNA 基本完全降解。表明此 RNA 不能耐受高浓度 RNA 酶的消化，

10 证实其确实为 RNA 分子。

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

<120> 抑制人肿瘤坏死因子活性的寡核苷酸

<130>

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

cgcgcgtaaa tcttctctg ttaccctctc ttcattgcg

40

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

cgctggagga cgatgttaat tagaccgcaa ctacattgca

40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

cgatctacgt ggtgactcat acgtgtcgat gtgcctttcc

40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 4
gcacactaag tttctacacg tctcgtcgcc ctctttgtgc 40

<210> 5
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 5
atggcgagct cggcgacaat cactttgggt actattggcc 40

<210> 6
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 6
cggtgtcccg gcactttgat cgtcgacctg ttgtattgcc 40

<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 7
ggcggggctct ctaaagtggt ttatcatctg cttgttggcc 40

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 8
cactgtaatc agaggctttt ttactctcgc tgcattccgg 40

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 9

gcccagcgtc cgacactaac tagtcgcca acaatcagcc

40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 10

tggcgagtat actcacaac ctctcacagg aacctggggc

40

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 11

tgcacaccgg tgatttagcc tggcgtgctt caccttcacc

40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 12

ccacgtctac acttaccct gtgacagcta tactcatcac

40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 13

ccccgccatg tgcttagtgc aataacgttc tcaccgcccc

40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 14

cactgtttga cgtttcggat taaggagtcc gctcgcaccc

40

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 15

tcccatcaaa accaaatttc gggctctgctc tctctctgcc

40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 16

tggggatgcg gtctgcctaa caacagggtc tcacttaccc

40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 17

ccgacgtact cggtagacaa gtcccctgaa gtgtgacgcc

40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 18

gcggccgata aggtctttcc aagcgaacga attgaaccgc

40

<210> 19

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

<400> 19

ggggcccaag acauacuagg cuggccaguc uauucuggug

40

<210> 20

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

<400> 20

aguaccacac acucaaucga gugcacggca aagcuuccgc

40

<210> 21

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

<400> 21

gcacgaucua cgaugcucac cagaggagug caucuucucc

40

<210> 22

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

<400> 22

gcaacaucau caccgaaccc guauugaguc aaauugugau

40

<210> 23

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

<400> 23

gcguagcaaa cgcaccgcac aggcccgcgg cuaagcauuu

40

<210> 24

<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 24
uccugcauga accuuuucuc cgcgcuucuu ggaccuaca

40

<210> 25
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 25
guucggcucc ccucacuaga cuacuguuaa gccucgaggu

40

<210> 26
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 26
gcuaauaugc cuaauccaac aucgagucug gucauuacag

40

<210> 27
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 27
guacccgauc uggccguauu uugacgacau caacgugcgg

40

<210> 28
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 28
ccaggguagua uccaaccaga acaacauacc cgacaaacgu

40

说明书附图

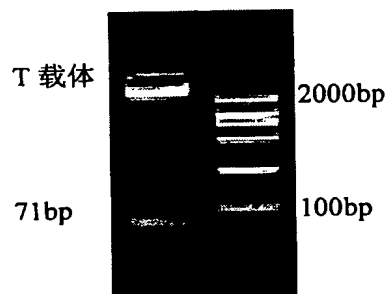


图 1

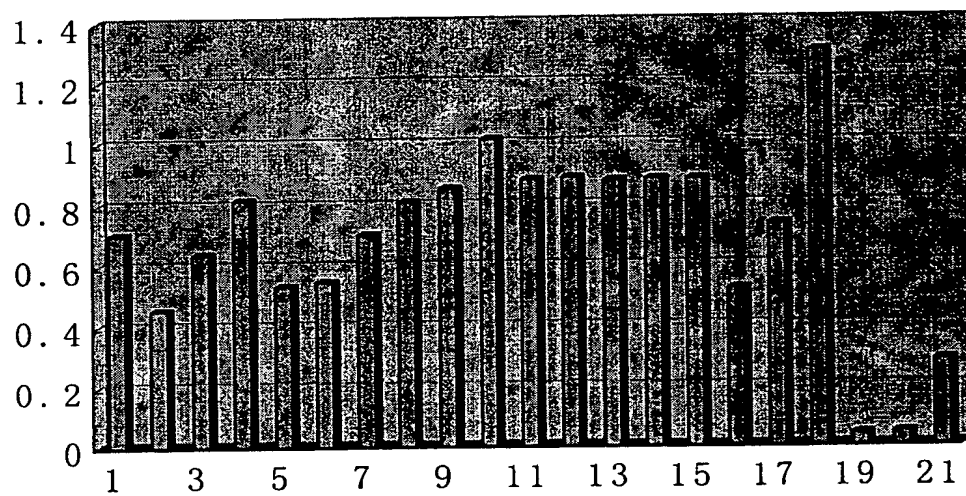


图 2

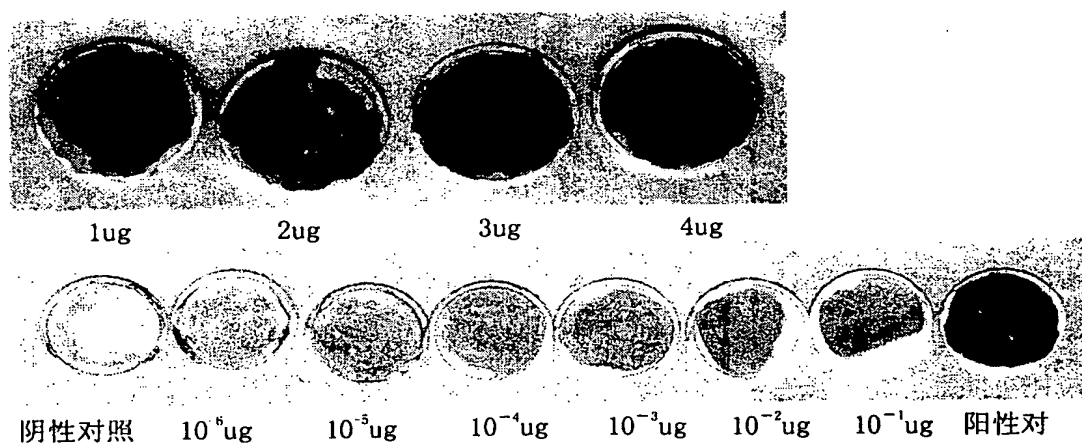


图 3

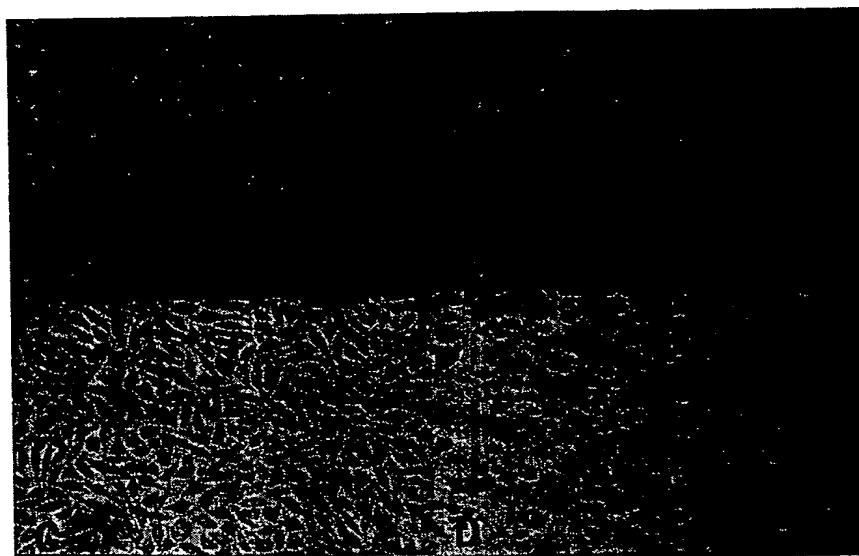


图 4

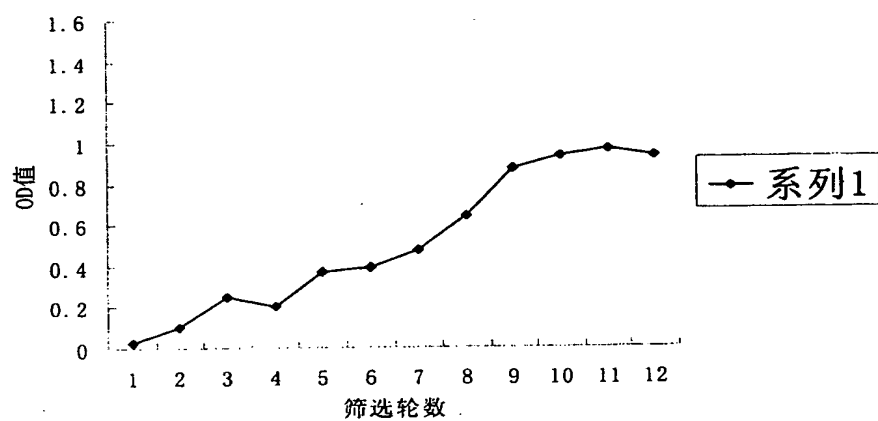


图 5

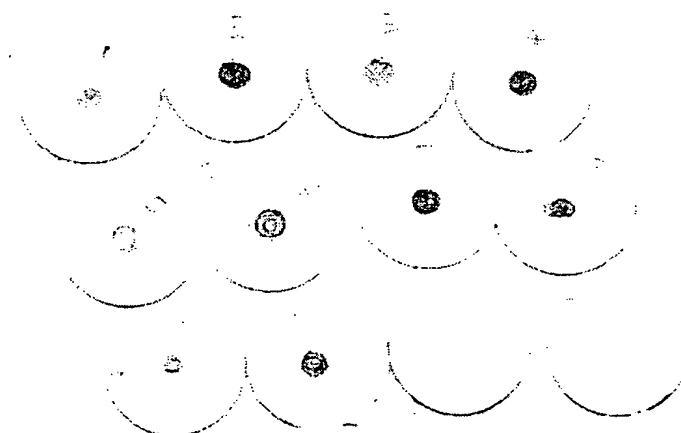


图 6

ELISA间接法检测RNA与TNF的结合力

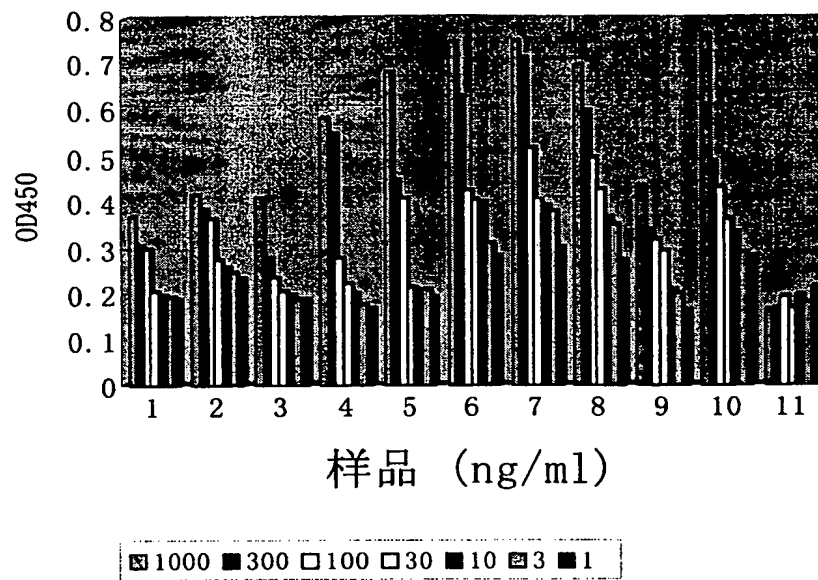


图 7

寡聚RNA对TNF杀伤L929细胞的保护作用

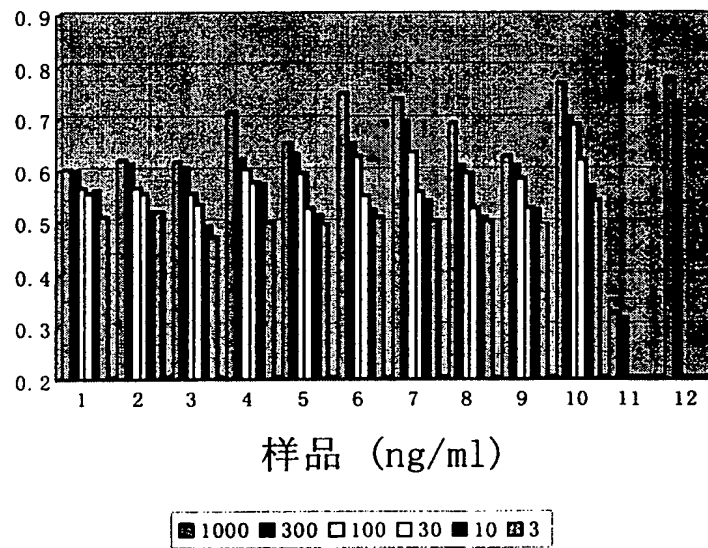


图 8

ELISA法检测截短后适配子亲和力的变化

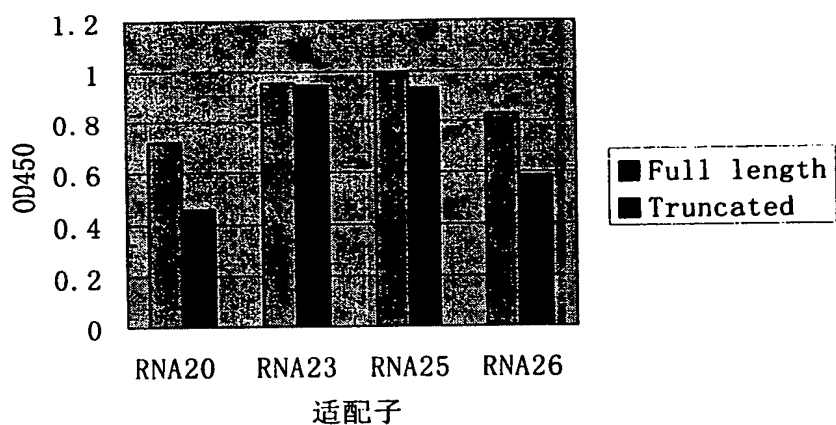


图 9

RNA适配子与TNF的亲合力

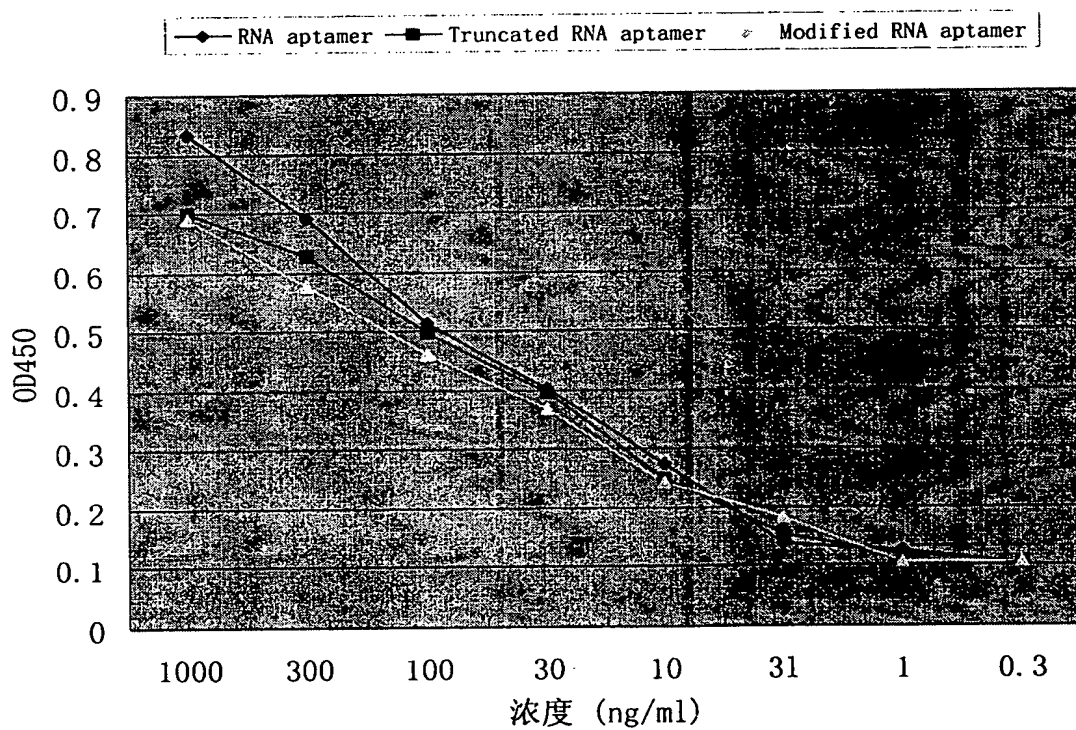


图 10

RNA aptamer 对TNF细胞毒性的抑制作用

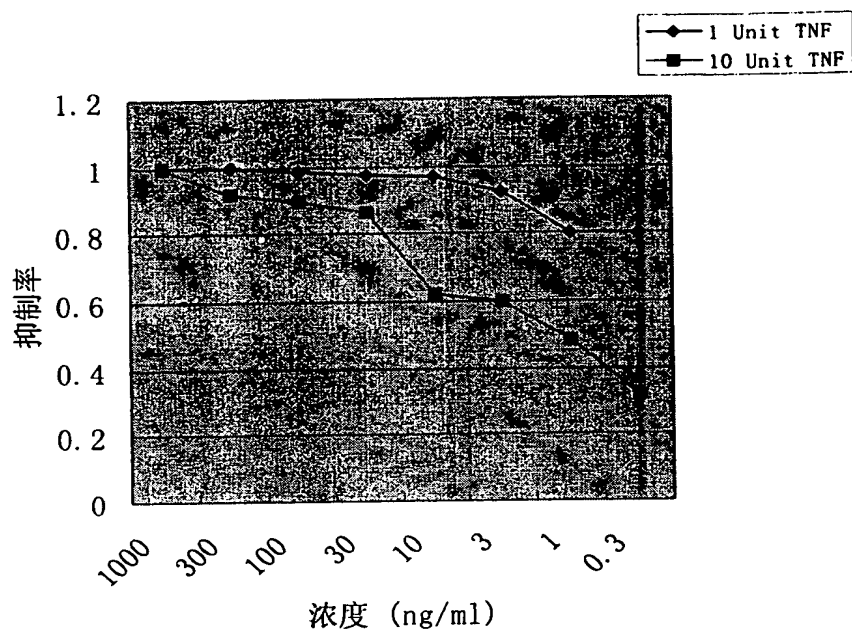


图 11

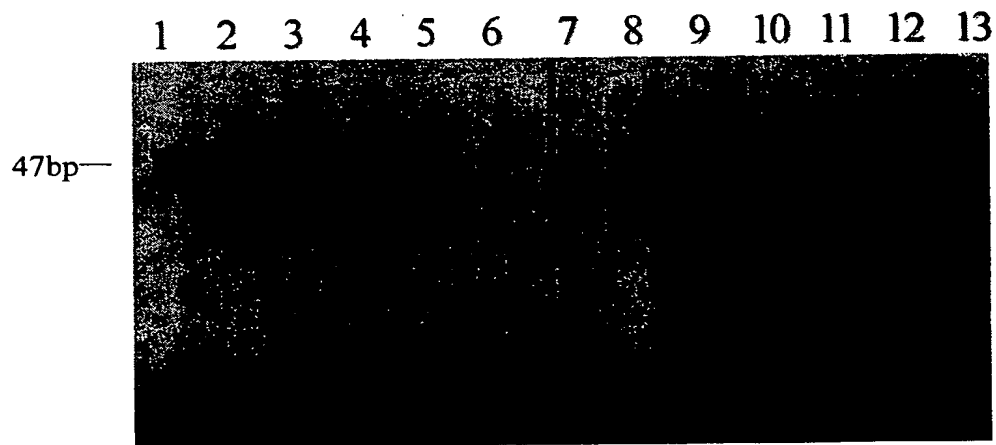


图 12